

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit

ユーザーガイド

製品番号
PLN10、PLN70、PLN350

SIGMA-ALDRICH®

注文情報

製品番号	製品概要	容量
PLN10	GenElute Plasmid Miniprep Kit	10回分
PLN70	GenElute Plasmid Miniprep Kit	70回分
PLN350	GenElute Plasmid Miniprep Kit	350回分

関連製品

製品番号	製品概要	容量
PFM10	GenElute Five-Minute Miniprep Kit	10回分
PFM50	GenElute Five-Minute Miniprep Kit	50回分
PFM250	GenElute Five-Minute Miniprep Kit	250回分
NA0200S	GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	4回分
NA0200	GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	25回分
NA0300S	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	4回分
NA0300	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	10回分
NA0310	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit	25回分
NA0400	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	4回分
NA0410	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	10回分
NA0500	GenElute HP Plasmid Megaprep Kit	5回分
NA0600	GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Megaprep Kit	5回分

製品の再注文はお近くの弊社販売代理店にて承
っています。

GenElute Plasmid Miniprep Kit

目次

製品概要	2
注意事項と免責事項	3
保存方法と安定性.....	3
使用前の準備.....	3
手順.....	4
結果.....	5
参考文献.....	5
トラブルシューティングガイド.....	6
補足.....	9
経験者向けプロトコル.....	13

製品概要

GenElute Plasmid Miniprep Kitは、組換え大腸菌の培養液からプラスミドDNAを簡単、迅速かつ低コストで分離することができる製品です。シリカメンブレン技術とスピンカラムの利便性を組み合わせることで、1~5 mlの大腸菌培養液から、最高で15 µgの高コピーのプラスミドDNAを30分以内に精製することができます。なお、実際の収率や培養液の最適な使用量は、使用するプラスミドや培地の種類によって異なりますのでご注意ください（手順1参照）。

オーバーナイト培養した組換え大腸菌の培養液を遠心して大腸菌を回収し、改変アルカリリ SDS溶解法で溶解して、DNAを高塩濃度下でシリカに吸着させます。^{1,2}次に、洗浄によって夾雑物を除去します。最後に、結合したDNAをTris-EDTA Bufferまたは水で溶出させます。

得られたプラスミドDNAは、主としてスーパーコイル構造を取っています。アガロースゲル電気泳動では、ゲノムDNAまたはRNAのコンタミネーションを示すバンドは認められません。得られたDNAは、制限酵素による切断、ライゲーション、シークエンシング、PCR +、トランスフェクションなど、下流の分析にそのまま使用することができます。

付属する試薬	製品番号	PLN10 10回分	PLN70 70回分	PLN350 350回分
Resuspension Solution	R1149	2.5 ml	15.5 ml	100 ml
RNase A Solution	R6148	0.25 ml	0.25 ml	0.6 ml
Lysis Solution	L1912	2.5 ml	15.5 ml	100 ml
Neutralization/Binding Solution	N5158	4 ml	65 ml	140 ml
Column Preparation Solution	C2112	7 ml	60 ml	225 ml
Optional Wash Solution	W4011	5.5 ml	40 ml	200 ml
Wash Solution Concentrate	W3886	2.5 ml	25 ml	75 ml
Elution Solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH approx. 8.0)	E5650	1.5 ml	8 ml	45 ml
GenElute Miniprep Binding Columns	G6415	10個	70個	350個
2 ml Collection Tubes	T5449	20個	140個	700個

キットの他にご用意いただく試薬および機器

- Ethanol (95-100%)、製品番号E7148、E7023、または459836
- マイクロ遠心機
- マイクロ遠心チューブ

注意事項と免責事項

GenElute Plasmid Miniprep Kitは試験研究用製品です。医薬品、家庭での使用など試験研究用以外の用途には使用できません。危険性と安全な取り扱いについては安全性データシート (MSDS) をご覧ください。

保存方法と安定性

本キットは室温で保存してください。本キットの保管中に試薬に沈殿が生じた場合は、以下の「使用前の準備」をご覧ください。

使用前の準備

- 1. 試薬を十分に混和します。** 試薬に沈殿が見られないか確認してください。試薬に沈殿が生じている場合は、55~65°Cで沈殿が溶解するまで加温し、室温まで冷却してからご使用ください。
- 2. Resuspension Solutionを調製します。** RNase A Solution (製品番号**R6148**) のチューブを軽くスピンドアウンし、溶液をチューブの底に集めてください。初めて使用するときは、13 μ l (10回分キットの場合)、78 μ l (70回分キットの場合) または500 μ l (350回分キットの場合) のRNase A SolutionをResuspension Solutionに添加してください。4°Cで保存してください。
- 3. Wash Solutionを調製します。** 初めて使用するときは、10 ml (10回分キットの場合)、100 ml (70回分キットの場合) または300 ml (350回分キットの場合) の95~100%エタノールでWash Solution Concentrateを希釈してください。エタノールの蒸発を防ぐため、希釈したWash Solutionのキャップは必ず締めてください。

手順

注意:遠心速度はいずれも遠心力 g の単位で表されています。遠心力 g の回転数への換算については、表1をご覧ください。ご使用の遠心機・ローターで必要な遠心力が得られない場合は、遠心力を最大に設定し、それに合わせて遠心時間を延長してください。遠心は、すべての液体がカラムを通過するまで行なってください。

全ての操作は室温で行なってください。

細胞を回収します。

オーバーナイト培養した組換え大腸菌 (*E. coli*) 1~5 ml を遠心してペレット状にします。培養液の最適な使用量は、プラスミドの種類や細胞密度によって異なります。収率を最大限に高めるには、下記の注意をご覧ください。適量の組換え大腸菌培養液をマイクロ遠心チューブに移し、 $>12,000 \times g$ で1分間遠心してペレット状にしてください。上清を捨ててください。

注意:LB (Luria Broth) 培地で培養した組換え大腸菌で最良の結果を得るには、培養液の使用量を、高コピーのプラスミドの場合は1~3 ml、低コピーのプラスミドの場合は1~5 mlにしてください。TB (Terrific Broth) 培地や2xYT培地のような栄養豊富な培地で培養した組換え大腸菌の場合は、培養液の使用量を1 mlにしてください。培養液の量が多すぎると、収率が低下する原因となります。

1. 細胞を再懸濁させます。



重要:

適量のRNase A Solutionを Resuspension Solutionに添加したことを確認してください。

細胞ペレットに200 μ lのResuspension Solutionを加え、完全に懸濁させてください。ボルテックスもしくはピペッティングによって、均一になるまで十分に懸濁させてください。不十分な再懸濁は収率が低下する原因となります。

このほか、細胞ペレットを簡単に再懸濁させる方法として、マイクロ遠心チューブを5x16穴のポリプロピレン製マイクロ遠心チューブラックに置いた状態で、マイクロチューブの底を前後に爪で5回弾いてもよいでしょう。³

2. 細胞を溶解します。

200 μ lのLysis Solutionを添加して、懸濁している細胞を溶解します。時間を置かず、透明で粘性のある溶液になるまで溶解液を穏やかに転倒混和してください(6~8回)。ボルテックスは行なわないでください。激しく混和するとゲノムDNAが切断されるため、最終精製物のプラスミドDNAに染色体DNAが混入する可能性があります。溶解反応は5分以内に終了させてください。アルカリによる長時間の溶解反応はスーパーコイル状のプラスミドを変性させ、精製後の用途に使用できなくなる可能性があります。

3. 中和します。

350 μ lのNeutralization/Binding Solutionを添加して、細胞片を沈殿させてください。4~6回、チューブを穏やかに転倒して溶液を混和してください。 $>12,000 \times g$ または最高速度で10分間遠心して細胞片をペレット状にしてください。細胞片、タンパク質、脂質、SDSおよび染色体DNAが、濁った粘性の沈殿物として現れます。遠心後も上清に多量の浮遊物が存在している場合は、もう一度上清を遠心してから手順6に進んでください。

4. カラムを準備します。

GenElute Miniprep Binding Columnsを付属のマイクロ遠心チューブに挿入します(あらかじめセットされていない場合)。500 μl のColumn Preparation Solutionを各Miniprep Columnに加え、12,000 $\times g$ で30秒から1分間遠心してください。カラムを通過した液体は捨ててください。

注意: Column Preparation Solutionをご使用になることで、メンブレンへのDNA結合量が最大化し、収量が安定します。

5. ライセートをロードします。

手順4で得られた清澄なライセートを、手順5で準備したカラムに移し、>12,000 $\times g$ で30秒から1分間遠心してください。カラムを通過した液体は捨ててください。

6. 洗浄 (オプション、endA+株を使用した場合のみ行ってください)

カラムに500 μl のOptional Wash Solutionを添加します。>12,000 $\times g$ で30秒から1分間遠心してください。カラムを通過した液体は捨ててください。

注意: この洗浄工程は、HB101、JM101、NMおよびPRシリーズのような野生型endA+遺伝子を持つ菌株を使用する場合に、精製したプラスミドDNAにヌクレアーゼが混入することを避けるために必要となります。

7. カラムを洗浄します。



重要:

Wash Solution 2のボトルにエタノールを加えてあることを確認してください。

カラムに750 μl の希釈したWash Solutionを添加します。>12,000 $\times g$ で30秒から1分間遠心してください。この洗浄によって、カラムに溶液を入れる際に持ち込まれ、そのまま残留した塩などの夾雑物を除去します。カラムを通過した液体を捨て、Wash Solutionを加えずに最大速度で1~2分間遠心し、余分なエタノールを除去してください。

8. DNAを溶出させます。

カラムを新しいCollection Tubelに移し変えてください。100 μl のElution Solutionまたは分子生物学グレードの水をカラムに添加します。DNAのシーケンシングや他の酵素反応に使用する場合には、水もしくはpH 8.0の5 mM Tris-HClで溶出してください。>12,000 $\times g$ で1分間遠心してください。溶出液にはプラスミドDNAが含まれています。この溶液はすぐに使用するか、-20°Cで保存してください。

注意: より濃度の高いプラスミドDNA溶液が必要な場合は、Elution Solutionの量を50 μl まで減らしてください。しかし、この場合、プラスミドDNAの総収量は減少する可能性があります。

結果

収率と純度は光学的分析により測定できます。280 nmでの吸光度に対する260 nmでの吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) は1.7~1.9となります。DNAのサイズと純度は、アガロースゲル電気泳動またはパルスフィールド電気泳動で測定できます。

参考文献

1. Birnboim, H. C., and Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1522 (1979).
2. Vogelstein, B., and Gillespie, D., Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 615-619 (1979).
3. Voo, K. S., and Jacobsen, B. M., Rapid resuspension of pelleted bacterial cells for miniprep plasmid DNA isolation. *BioTechniques*, **24**, 240-243 (1998).

トラブルシューティングガイド

プラスミドDNAの収率が低い、
または回収できない

原因——Wash Solutionの濃度が濃すぎる。

対策——Wash Solution Concentrateが規定量のエタノールで希釈されているか確認してください。使用する
とき以外は、揮発を防ぐため、フタをしっかりと閉めてく
ださい。

原因——細胞数が不十分である。

対策——培養液が古すぎる可能性があります。培養液
を新たに調製してください。

または、

細胞密度を確認してください。OD₆₀₀が2.0~3.0となるま
で培養してください。

原因——プラスミドの複製が十分でない。

対策——培養の条件が最適であったか、培養液の選択
が適切であったかを確認してください。

原因——抗生物質の活性が不十分である。

対策——大腸菌のオーバーナイト培養には、新しい抗
生物質を使用してください。多くの抗生物質は光感受性
であるため、2~8℃で長期間保存すると失活します。

原因——アルカリ溶解の時間が長い。

対策——手順3で溶解時間を3分間に短縮するか、細胞
懸濁液が透明な粘性のある液体になった時点で溶解反
応を終了させてください。

原因——細胞片の沈殿が不十分である。

対策——少ない培養液量から精製を始めてください。

原因——溶解反応が不完全である。

対策——少ない培養液量から精製を始めるか、目視で
確認しながら溶解時間(手順3)を延長してください。

吸光度から求めた精製DNAの量が実際の量と一致しない (A_{260}/A_{280} 比が高すぎる、または低すぎる)

原因——カラムに入れたサンプルの量が多すぎたため、精製が不十分である。

対策——少ない培養液量から精製を始めてください。

原因——シリカの微粉末の混入により、バックグラウンドが高くなっている。

対策——DNAサンプルを最高速度で1分間遠心し、その上清を用いて吸光度を再測定してください。

原因——Wash Solutionを希釈したエタノールに不純物が含まれている。

対策——エタノールの250~300 nmでの吸光度を確認してください。吸光度が高い場合、そのエタノールは使用しないでください。洗浄後、カラムに微量の不純物が残り、最終精製物の吸光度に影響を及ぼす場合があります。

原因——DNAにRNAが混入している。RNase A処理が不十分である。

対策——初めて使用する際には、RNase A SolutionにResuspension Solutionに加えたか確認してください。RNase A Solutionは、65℃以上の高温で、または室温での6ヶ月以上の長期保存により失活します。

原因——プラスミドDNAに染色体DNAが混入している。

対策——24時間以上培養した細胞や死細胞は使用しないでください。溶解反応(手順3)や中和(手順4)の最中には、ボルテックスや激しい振とうを行なうことは避けてください。

電気泳動で、スーパーコイル状プラスミドの前にバンドが現れる

原因——プラスミドDNAの一部が変性している。

対策——手順3の溶解反応は5分以内に終了させてください。ニックが入った(開環状の)二本鎖プラスミドDNAは、スーパーコイル状プラスミドDNAよりも泳動速度が遅くなります。

精製後の酵素反応がうまくいかない

原因——精製が不完全である。

対策——いずれかの試薬に塩の沈殿が生じている可能性があります。試薬を65℃に加熱して、沈殿を溶解してください。加熱した試薬は、室温まで冷却してからご使用ください。

原因——DNA濃度が低すぎる。

対策——DNAのエタノール沈殿を行ない、少量の Elution Solutionまたは水にDNAを再懸濁させてください。

または、

シリカに結合したDNAを溶出する際に使用するElution Solutionの量を減らしてください。Elution Solutionの量を少なくすると、総収量も低下しますのでご注意ください。

原因——endA⁺株からDNAを精製した。

対策——endA⁺株からDNAを精製する場合には、必ず洗浄(手順7)を行なってください。

原因——精製したプラスミドDNA溶出液の塩濃度が高すぎる。

対策——エタノール沈殿を行なってDNAを回収してください。ペレットを乾燥させてください。乾燥させたペレットを、水またはElution Solutionにもう一度溶解してください。Elution SolutionにはEDTAが含まれており、多くの酵素にとって重要な補因子である二価の陽イオン(Mg²⁺など)をキレートしますのでご注意ください。

原因——Wash Solution中のエタノールがカラムに残っている。

対策——洗浄後(手順8)にカラムを再度、1分間遠心して、残っているWash Solutionを取り除いてください。

関連製品	製品番号	関連製品	製品番号
Water, Molecular Biology Reagent	W4502	Ethidium bromide, aqueous, 10 mg/ml	E1510
Precast Agarose Gels, 1.0%, 8 well	P5472	GenElute HP Plasmid Maxiprep Kits	NA0300S NA0300 NA0310
TAE Buffer (10X)	T9650	GenElute HP Plasmid Midiprep Kits	NA0200S NA0200
Gel Loading Solution	G2526	TBE Buffer (10X)	T4415
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	D7058		

補足

表1. 遠心力(g の単位)から、一般的なローターの回転数への換算

遠心機	ローター	チューブ (最大)	半径 (cm)	300× g での 回転数	12,000× g で の回転数	16,000× g で の回転数
Eppendorf社製 5410		12	5.8	2,143	13,555	15,652
5415C	F45-18-11	18	7.3	1,917	12,124	14,000
5415D&R	F45-24-11	24	8.3	1,801	11,392	13,155
5417C,D,&R	F45-30-11	30	9.5	1,681	10,634	12,279

一般的な遠心機とローターの一部について、遠心速度(回転数)を上表に記載しています。表にないローターの場合、適切な回転数は次式で計算できます。

$$\text{RPM} = \sqrt{\text{RCF} / 1.118 \times 10^{-5} r}$$

ここで、RCF = g の単位で表した、目的の重力加速度(相対遠心力)、

r = cmの単位で表したローターの半径、

RPM = 目的の遠心力 g を得るために必要な1分間の回転数。

メモ

経験者向けプロトコル

特に記載のない限り、全ての遠心は $>12,000 \times g$ で行なってください。

1 細菌を回収し、溶解します。

- 1~5 mlのオーバーナイト培養液を1分間遠心して、細胞をペレット状にしてください (TB培地または2xYT培地の場合は1 ml、LB培地の場合は1~5 ml)。上清を捨ててください。
 - 細胞を200 μ lのResuspension Solution中で再懸濁させます。ピペティングまたはボルテックスにより混和してください。
 - 200 μ lのLysis Solutionを添加してください。穏やかに転倒混和してください。ボルテックスは行なわないでください。透明になるまで5分間静置してください。
- * Resuspension Solutionを初めて使用するときは、必ず適量のRNase A Solutionと混合したことを確認してください。

2 ライセートを清澄化します。

- 350 μ lのNeutralization Solution (S3) を添加してください。4~6回、穏やかに転倒混和してください。
- 最高速度で10分間遠心し、細胞片をペレット状にしてください。

3 カラムを準備します。

- 500 μ lのColumn Preparation Solutionを、Collection Tubelに装着したカラムに添加してください。
- $>12,000 \times g$ で1分間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。

4 プラスミドDNAをカラムに結合させます。

- 清澄なライセートをカラムに移し入れてください。
- 1分30秒間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。

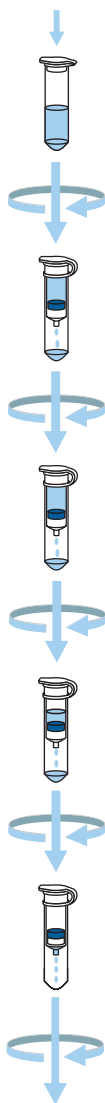
5 洗浄して夾雑物を取り除きます。

- オプション (endA⁺株のみ) : 500 μ lのOptional Wash Solutionをカラムに添加してください。1分30秒間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。
 - 750 μ lのWash Solutionをカラムに添加してください。1分30秒間遠心してください。カラムを通過した液体を捨ててください。
 - カラムを1分間遠心して乾燥させます。
- * Wash Solution Concentrateを初めて使用する際には、必ずエタノールで希釈してください。

6 精製されたプラスミドDNAを溶出させます。

- カラムを新しいCollection Tubelに移してください。
 - 100 μ lのElution Solutionを添加してください。1分間遠心してください。
- * より濃度の高いプラスミドDNA溶液が必要な場合は、溶出量を50 μ lまで減らすことができます。

Bacterial culture



Pure Plasmid DNA

国際本部

3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103

(314) 771-5765

sigma-aldrich.com

ご注文／お近くの代理店にお問い合わせください。弊社カスタマーサービス

(03) 5796-7320・Fax (03) 5796-7325

テクニカルサポート (03) 5796-7330・sigma-aldrich.com/techservice

開発／大量製造に関するお問い合わせSAFC (800) 244-1173

SIGMA-ALDRICH

シグマ アルドリッチグループ

©2007 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA、、SAFC、SAFC、SIGMA-ALDRICH、、ISOTEC、ALDRICH、、FLUKA、、SUPELCO

は、Sigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich Biotechnology LP.の商標です。

Riedel-de Haën[®]は、Riedel-de Haën GmbHからのライセンスに基づく商標です。SIGMA製品の販売は、Sigma-

Aldrich, Inc.を通じて行なわれます。Sigma-Aldrich, Inc.は、同社製品が本ガイドや他のSigma-Aldrich発行物

に記載されている情報に適合することを保証します。購入者は自身の責任において、目的とする用途に同社製

品が適しているかを判断してください。場合により、他の条項も適用されます。納品書または内容明細書の裏

面をご覧ください。GenElute[™]、DirectLoad[™]、SAFC[™]はSigma-Aldrich Co.とその関連会社であるSigma-Aldrich

Biotechnology LP.の商標です。

特許出願中。

† PCR法は、Hoffman-LaRoche社が所有する特許によって保護されています。

ライフサイエンス、

先端技術、サービスを主導し、皆様の研

究を成功に導くお手伝いをしています。

02260-502620
0027